

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/31, 1/21, C12P 13/08, 13/14</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/02692</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年1月21日(21.01.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/03017  <b>(22) 国際出願日</b> 1998年7月3日(03.07.98)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/184176 1997年7月9日(09.07.97) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 木村英一郎(KIMURA, Eiichiro)(JP/JP) 矢越知津(YAGOSHI, Chizu)(JP/JP) 中村 純(NAKAMURA, Jun)(JP/JP) 大住 剛(OSUMI, Tsuyoshi)(JP/JP) 中松 亘(NAKAMATSU, Tsuyoshi)(JP/JP) 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AU, BR, CN, ID, JP, PL, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54)Title: TEMPERATURE SENSITIVE dtsR GENES</b>  <b>(54)発明の名称</b> 温度感受性dtsR遺伝子  <b>(57) Abstract</b> DNAs encoding the following proteins (A) or (B) which participate in the temperature sensitivity to surfactants of corynebacteria: (A) a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 or a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 wherein Leu at the 139-position is substituted by another amino acid residue excluding Pro and having a temperature sensitive DTSR activity; and (B) proteins derived from the above proteins (A) by substitution, deletion, insertion, addition or inversion of one or several amino acid residues except the one at the 139-position in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 and having the temperature sensitive DTSR activity.		

# (57)要約

コリネ型細菌の界面活性剤に対する温度感受性に関与する下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の 139 番目の L e u 残基が P r o を除く他のアミノ酸残基に変化した配列を有し、温度感受性 D T S R 活性を有するタンパク質。

(B) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の 139 番目の L e u 残基が P r o を除く他のアミノ酸残基に変化した配列において、139 番目のアミノ酸残基以外の位置における 1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、温度感受性 D T S R 活性を有するタンパク質。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GB	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GD	グレナダ	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	HR	クロアチア		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IN	インド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン			NO	ノルウェー		
CN	中国			NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	JP	日本	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KR	韓国	SD	スーダン		
EE	エストニア	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
		LI	リヒテンシュタイン				

## 明細書

温度感受性 d t s R 遺伝子

## 技術分野

本発明は、温度感受性 d t s R 遺伝子に関し、詳しくは、コリネ型細菌の界面活性剤に対する耐性に関与するタンパク質であって、温度感受性変異を有するタンパク質をコードする遺伝子に関する。また、この遺伝子を保持し、L-リジン及びL-グルタミン酸の生産能を有するコリネ型細菌及びこのコリネ型細菌を用いる発酵法によるL-リジン及びL-グルタミン酸の製造方法に関する。

## 背景技術

従来、L-リジン及びL-グルタミン酸は、これらのアミノ酸生産能を有するブレヴィバクテリウム属やコリネバクテリウム属に属するコリネ型細菌を用いて発酵法により工業生産されている。この方法では、コリネ型細菌は生育にビオチンを要求する一方、培地中に過剰量のビオチンが存在すると、L-グルタミン酸が蓄積しないことが知られている。従って、従来のL-グルタミン酸の製造法においては、ビオチン濃度を制限した培地で培養するか、あるいはビオチンを充分量含有する培地を用いる場合には、培養の初発または途上でビオチン作用抑制物質として界面活性剤またはラクタム系抗生物質を培地に含有させて培養するかのいずれかの方法が採用されている。しかしながら、特に培地の炭素源として廃糖蜜等の安価ではあるが過剰量のビオチンを含有する原料を使用する場合、培地に添加することが必要なビオチン作用抑制物質が製造コスト高の原因となっていた。

これに対し、本発明者らは、コリネバクテリウム属細菌に由来し、該細菌に界面活性剤に対する耐性を付与するタンパク質（D T S R 蛋白）をコードする遺伝子（d t s R 遺伝子）の存在を突き止め、この遺伝子が破壊されたコリネ型L-グルタミン酸生産菌は、野生株がほとんどL-グルタミン酸を生成しない量のビオチンが存在する条件においても著量のL-グルタミン酸を生成すること、及び、L-リジン生産能を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌は、d t s R 遺伝子を増幅するとL-リジンを生産する能力が増強されることを見出している（WO

95/23224号国際公開パンフレット)。

また、本発明者らは、コリネ型L-グルタミン酸生産菌に、ビオチン作用抑制物質に対する温度感受性を付与することにより、ビオチン存在下でも安定してL-グルタミン酸を発酵生産することができること、及び、このようなビオチン作用抑制物質に対する温度感受性株にL-リジン生産性を付与することにより、ビオチン存在下でも、安定してL-リジンとL-グルタミン酸を同時に発酵生産することができることを見出している。そして、コリネ型細菌にビオチン作用抑制物質に対する温度感受性を付与する手段の一つとして、温度感受性変異型DTSR蛋白をコードする変異型d t s R遺伝子を用いた遺伝子置換を開示している(WO96/06180号国際公開パンフレット)。

#### 発明の開示

上記したように、コリネ型細菌を用いた発酵法によるアミノ酸の製造において、d t s R遺伝子の有効な利用法が開発されている。本発明は、さらにd t s R遺伝子を有効に利用するために、温度感受性変異型DTSR蛋白をコードする新規な変異型d t s R遺伝子を提供することを課題とする。

本発明者は、すでに取得されているd t s R遺伝子に変異処理を行い、温度感受性変異を有するDTSR蛋白をコードする新規な変異型d t s R遺伝子を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNAを提供する。

(A) 配列番号2に記載のアミノ酸配列、または配列番号2に記載のアミノ酸配列の139番目のLeu残基がProを除く他のアミノ酸残基に変化した配列を有し、温度感受性DTSR活性を有するタンパク質。

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列、または配列番号2に記載のアミノ酸配列の139番目のLeu残基がProを除く他のアミノ酸残基に変化した配列において、さらに、139番目のアミノ酸残基以外の位置における1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、温度感受性DTSR活性を有するタンパク質。

上記DNAとして具体的には、下記（a）又は（b）に示すDNAが挙げられる。

（a）配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号359～1987からなる塩基配列を含むDNA。

（b）配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号359～1987からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ、温度感受性DTSR活性を有するタンパク質をコードするDNA。

以下、上記のいずれかのDNAを、「本発明の遺伝子」又は「変異型d t s遺伝子」、これらのDNAがコードするタンパク質を「変異型DTSRタンパク質」ということがある。

また、本発明は、本発明の遺伝子を保持し、野生型DTSRタンパク質を保持せず、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌、及び、このコリネ型細菌を、液体培地で培養し、培地中に、L-グルタミン酸を生成蓄積させ、L-グルタミン酸を該培地から採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造方法を提供する。

さらに、本発明は、L-リジン生産能をさらに有する上記コリネ型細菌、並びに、このコリネ型細菌を、液体培地で培養し、培地中に、L-リジン及びL-グルタミン酸を生成蓄積させ、L-リジン及びL-グルタミン酸を該培地から採取することを特徴とするL-リジン及びL-グルタミン酸の製造方法を提供する。

尚、本発明においてDTSR活性とは、DTSRタンパク質が有する活性であって、具体的には、コリネ型細菌細胞中で界面活性剤に対する耐性に関与する活性をいう。DTSRタンパク質は、例えば、コリネ型細菌の界面活性剤変異株（野生型のコリネ型細菌の生育に影響を与えない濃度の界面活性剤が存在する培地中で、生育が悪くなったコリネ型細菌に属する変異株）の細胞中に存在させたときに、界面活性剤に対する感受性を失わせる活性を有する。

また、温度感受性DTSR活性とは、コリネ型細菌の最適生育温度（31.5℃）ではDTSR活性を示すが、33ないし37℃以上、好ましくは34℃以上ではDTSR活性が低下する性質をいう。

また、本発明にいうコリネ型細菌とは、バーギーズ・マニュアル・オブ・デタ

ーミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版599頁(1974)に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有しない桿菌であり、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合されたブレビバクテリウム属細菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)) を含み、またコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌及びミクロバテリウム属細菌を含む。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の遺伝子は、野生型コリネ型細菌由来の d t s R 遺伝子を含む組換えDNAを変異剤処理し、これをコリネ型細菌に属する界面活性剤感受性変異株に導入し、組換えDNAが導入されていない変異株が生育できない濃度の界面活性剤を含む培地において、31.5℃では生育するが、これよりも高い温度、例えば35℃では生育しない株を選択し、得られた株より前記組換えDNAを回収することによって得られる。

野生型コリネ型細菌由来の d t s R 遺伝子は、WO95/23224号国際公開パンフレットに記載されている方法にしたがって取得することができる。以下に、コリネ型細菌の界面活性剤感受性変異株を利用して野生型 d t s R 遺伝子を取得する方法、及びこの野生型 d t s R 遺伝子を用いて変異型 d t s R 遺伝子を取得する方法を説明する。

コリネ型細菌の野生株から、例えば斎藤らの方法 (H. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619 (1963)) に従い染色体DNAを回収する。回収した染色体DNAを制限酵素を用いて切断し、コリネ型細菌で機能するベクターに連結し、各種組換えDNAを得る。

前記コリネ型細菌で機能するベクターとは、例えばコリネ型細菌で自律複製できるプラスミドである。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- |              |                   |
|--------------|-------------------|
| (1) pAM 330  | 特開昭58-67699号公報参照  |
| (2) pHM 1519 | 特開昭58-77895号公報参照  |
| (3) pAJ 655  | 特開昭58-192900号公報参照 |
| (4) pAJ 611  | 同上                |



- |           |         |                             |   |
|-----------|---------|-----------------------------|---|
| (5) p A J | 1 8 4 4 | 同                           | 上 |
| (6) p C G | 1       | 特開昭 5 7 - 1 3 4 5 0 0 号公報参照 |   |
| (7) p C G | 2       | 特開昭 5 8 - 3 5 1 9 7 号公報参照   |   |
| (8) p C G | 4       | 特開昭 5 7 - 1 8 3 7 9 9 号公報参照 |   |
| (9) p C G | 1 1     | 同                           | 上 |

界面活性剤感受性変異株としては、例えば界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテートの場合、0.1～1 mg/dlの濃度のポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート添加された培地で、生育が野生株と比較して悪い変異株が挙げられる。尚、野生型のコリネ型細菌は0.1～1 mg/dlの濃度の上記界面活性剤が添加された培地中でも生育に大きな変化はみられない。このような界面活性剤感受性変異株としては、具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム A J 1 1 0 6 0 が挙げられる。同株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-0046 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に寄託されており、受託番号 F E R M P - 3 6 7 8 が付与されている。

上記のようにして得られる各種組換えDNAをコリネ型細菌の界面活性剤感受性変異株に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K - 1 2 について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)）があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法（Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)）がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法（Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)）も応用できる。本発明の実施例で用いた形質転換の方法は、電気パルス法（特開平 2 - 2 0 7 7 9 1 号公報

参照)である。

次に、形質転換株を、一旦、界面活性剤を含まないM-CM2G寒天プレート(グルコース5g、ポリペプトン10g、酵母エキス10g、NaCl5g、DL-メチオニン0.2g、寒天15g及びクロラムフェニコール4mgを純水1Lに含む。pH7.2)に塗布して数万個のコロニーを形成させる。当該コロニーを30mg/Lの界面活性剤(Tween40)を含むM-CM2Gプレートにレブリカし、界面活性剤含有M-CM2Gプレート上で良好な生育を示すものを取得することにより、界面活性剤感受性を失った株を取得できる。

界面活性剤感受性が失われた形質転換株より組換えDNAを、野生型コリネ型細菌の染色体DNAと同様にして調製、ベクターに連結されている野生型コリネ型細菌の染色体DNA断片の塩基配列を決定し、d t s R遺伝子が含まれていることを確認する。

以上のようにして、d t s R遺伝子を取得することができる。

また、d t s R遺伝子は、すでに報告されているd t s R遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、コリネ型細菌染色体DNAを鋳型とするPCRによってd t s R遺伝子を含むDNA断片を増幅することによっても、取得することができる。さらに、d t s R遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、コリネ型細菌染色体ライブラリーをスクリーニングすることによっても、d t s R遺伝子を取得することができる。

なお、d t s R遺伝子を含むプラスミドpDTR6を保持するエシェリヒア・コリJM109/pDTR6(プライベートナンバーAJ12967)株は、1994年2月22日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305-0046 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に受託番号FERM P-14168として寄託され、1995年2月9日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-4994が付与されている。

変異型d t s R遺伝子は、野生型d t s R遺伝子を含むDNAに変異処理を施すことによって得ることができる。具体的には、野生型d t s R遺伝子を含む組換えDNAを、次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤によって

変異処理する (Shortle, D. and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 270(1978))。変異処理した組換えDNAを、上記と同様にしてコリネ型細菌の界面活性剤感受性変異株に導入し、形質転換体を得る。この形質転換体から、形質転換されていない変異株が生育できない濃度の界面活性剤、例えば30mg/Lのポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテートを含む培地において、31.5℃では生育するが33ないし37℃以上では生育しない株を選択する。選択された株より前記組換えDNAを回収すれば、変異型d t s R遺伝子を得ることができる。

上記のようにして得られる本発明の遺伝子の例として、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869株由来のd t s R遺伝子に変異処理を施して得られた変異型d t s R遺伝子の塩基配列を、配列表の配列番号1に示す。また、変異型d t s R遺伝子がコードする変異型D T S Rタンパク質のアミノ酸配列を配列番号2に示す。尚、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869株由来の野生型D T S Rタンパク質は、配列番号2に示すアミノ酸配列において139番目のアミノ酸残基がP r o残基であるアミノ酸配列を有する。また、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869株の野生型d t s R遺伝子は、配列番号1において774番目の塩基がCである塩基配列を有する。

本発明により、温度感受性を有する変異型D T S Rタンパク質のアミノ酸配列、及び変異型D T S Rタンパク質をコードする変異型d t s R遺伝子の塩基配列が明らかとなったので、野生型d t s R遺伝子に、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987)) によって変異を導入することによっても、変異型d t s R遺伝子を取得することができる。すなわち、野生型d t s R遺伝子では、配列番号1に示すアミノ酸配列において、139番目のコドンはP r o残基をコードしているが、これを、P r o以外のアミノ酸残基、好ましくはL e u残基をコードするコドンに置換すればよい。P r o以外のアミノ酸残基としては、139番目のP r o残基をそのアミノ酸残基に変化させたときに、変異型D T S Rタンパク質が温度感受性D T S R活性を有するものであれば特に制限されないが、好ましくはL e u残基が挙げられる。

本発明の遺伝子は、配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 359～1987 で表される塩基配列を有する DNA の他に、配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする DNA、及び配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、139 番目の Leu 残基が、Pro を除く他のアミノ酸残基に変化した配列をコードする DNA を含む。また、上記 DNA に、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 139 番目のアミノ酸残基以外の位置において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を生じる変異が加わっても、コードされるタンパク質が温度感受性 DTSR 活性を有する限り、そのような DNA は本発明の遺伝子に含まれる。

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 139 番目のアミノ酸残基以外の位置において 1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA は、例えば、139 番目のアミノ酸残基が Pro 以外のアミノ酸残基に変化した DTSR タンパク質をコードする d t s R 遺伝子、具体的には配列番号 1 に示す塩基配列を有する d t s R 遺伝子を保持するコリネ型細菌を突然変異処理し、得られる変異株から、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 359～1987 で表される塩基配列の少なくとも一部を有する DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA を単離することによって、取得され得る。また、同種変異体または対立遺伝子変異体としても単離され得る。

突然変異処理としては、紫外線照射または N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

上記の「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い DNA 同士、例えば 90% 以上の相同性を有する DNA 同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い DNA 同士がハイブリダイズしない条件、あるいは温度が完全にマッチしたハイブリッドの  $T_m \sim (T_m - 30) ^\circ\text{C}$ 、好ましくは  $T_m \sim (T_m - 20) ^\circ\text{C}$  の範囲で、かつ  $1 \times \text{SSC}$ 、好ましくは  $0.1 \times \text{SSC}$  に相当する塩濃度でハイ

ブリダイズする条件が挙げられる。

また、139番目のアミノ酸残基以外の位置における1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むDTSRタンパク質をコードするDNAは、部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加又は逆位を起こすように塩基配列を改変することによって得られる。

上記のようにして得られるDNAのうち、温度感受性DTSR活性を有し、かつ、139番目のアミノ酸残基以外の部位において変異が生じたDTSRタンパク質をコードするものを選択することによって、変異を導入することができる位置、又は変異が生じた位置を決定することができる。導入される変異の位置は、温度感受性DTSR活性に実質的に影響のない限り、特に制限されない。また、導入される変異の数は、タンパク質の立体構造における変異されるアミノ酸の位置や種類によっても異なり、温度感受性DTSR活性に実質的に影響のない限り、特に制限されないが、通常、1～20個、好ましくは1～10個である。

本発明の遺伝子は、L-グルタミン酸の製造に好適に利用することができる。例えば、本発明の遺伝子を保持し、野生型DTSRタンパク質を保持せず、かつ、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌は、界面活性剤に対する温度感受性を有する。このようなコリネ型細菌は、31.5℃程度で培養して生育させた後に、培養温度を33ないし37℃以上にシフトさせると、過剰量のビオチンを含有する培地中にて界面活性剤の非存在下でも、L-グルタミン酸を生産することができる。

従って、本発明により、本発明の遺伝子を保持し、野生型DTSRタンパク質を保持せず、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌（以下、本発明のL-グルタミン酸生産菌ともいう）、及び、このコリネ型細菌を、液体培地で培養し、培地中に、L-グルタミン酸を生成蓄積させ、L-グルタミン酸を該培地から採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造方法も提供される。

本発明のL-グルタミン生産菌は、本発明の遺伝子を含む組換えDNAを、既に確立している相同組換えの手法（Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162,

1196(1985)) 等により、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌の染色体上の野生型 d t s R 遺伝子と置換することによって、取得することができる。L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌は、公知のものを使用できる（例えば、WO 96/06180 号国際公開パンフレット参照）。

本発明において上記 L-グルタミン酸生産菌の培養に用いられる液体培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類、生育因子等を含有する通常の栄養培地が用いられる。上記 L-グルタミン酸生産菌は、過剰量のビオチンを含有する液体培地で培養してもビオチン作用抑制物質を培地に含有させることなく L-グルタミン酸を生産する能力を有する。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、廃糖蜜、澱粉加水分解物等の炭水化物、エタノール、グリセロール等のアルコール類、酢酸等の有機酸類が使用される。窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、アンモニア、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、酵母エキス、コーン・スティープ・リカー等が使用される。栄養要求性を有する L-グルタミン酸生産菌を用いる場合には、それらの要求物質を標品もしくはそれを含有する天然物として添加する。

発酵は、振とう培養、通気攪拌培養等による好気条件下にて、培養液の pH を 5～9 の間に保持しつつ 2～7 日間行う。pH の調節には、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガス、アンモニア水等を用いる。培養温度は 24～37℃であるが、31.5℃付近で培養を開始し、培養の途中で 33～40℃、好ましくは 37℃付近に温度を上昇させることによりさらに良好な結果が得られる。すなわち、生育至適温度付近にて菌を十分増殖させた後、培養途中で温度を上昇させることにより、ビオチン作用抑制物質を添加することなく、L-グルタミン酸の生産が開始され、培養液中に L-グルタミン酸が著量、生成蓄積される。

培養液中に生成蓄積した L-グルタミン酸を採取する方法は常法によって行えばよく、例えばイオン交換樹脂法、晶析法等によることができる。具体的には、L-グルタミン酸を陰イオン交換樹脂により吸着、分離させるか、または中和晶析させればよい。

上記 L-グルタミン酸生産菌は、さらに L-リジン生産能を有するものであっ

てもよい。このようなコリネ型細菌（以下、本発明のＬーリジン生産菌ともいう）を、液体培地で培養し、培地中に、Ｌーリジン及びＬーグルタミン酸を生成蓄積させ、Ｌーリジン及びＬーグルタミン酸を該培地から採取することによりＬーリジン及びＬーグルタミン酸を製造できる。

本発明のＬーリジン生産菌は、上記のように相同組換えの手法等により、本発明の遺伝子を含む組換えDNAを、Ｌーリジン及びＬーグルタミンの両方の生産能を有するコリネ型細菌の染色体上の野生型 d t s R 遺伝子と置換することによって、取得することができる。Ｌーリジン及びＬーグルタミン酸の生産能を有するコリネ型細菌は、公知のものを使用できる（例えば、WO 96/06180 号国際公開パンフレット参照）。あるいは、本発明のＬーグルタミン生産菌に、特公昭 48-28078 号公報などに記載の方法に従ってＬーリジン生産能を付与することによっても本発明のＬーリジン生産菌を取得することができる。

本発明のＬーリジン生産菌の培養に用いられる液体培地としては、本発明のＬーグルタミン酸生産菌の培養に用いられるのと同様の炭素源、窒素源、無機塩類、生育因子等を含有する通常の栄養培地が用いられる。本発明のＬーリジン生産菌は、過剰量のビオチンを含有する液体培地で培養してもビオチン作用抑制物質を培地に含有させることなくＬーリジン及びＬーグルタミン酸を生産する能力を有する。

発酵は、振とう培養、通気攪拌培養等による好気条件下にて、培養液の pH を 5～9 の間に保持しつつ 2～7 日間行う。pH の調節には、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガス、アンモニア水等を用いる。培養温度は 24～37℃であるが、31.5℃付近で培養を開始し、培養の途中で 33～40℃、好ましくは 34℃付近に温度を上昇させることによりさらに良好な結果が得られる。すなわち、31.5℃付近では主としてＬーリジンを生成するが、培養途中で温度を上昇させることによりＬーグルタミン酸の生成される割合が増加する。これを利用して最終的に得られる培養液中のＬーリジンとＬーグルタミン酸の比率を望ましいものに制御することができる。

培養液中に生成蓄積したＬーリジンとＬーグルタミン酸を採取する方法は常法でよく、例えばイオン交換樹脂法、晶析法等によることができる。イオン交換樹脂

脂法では、培養液からまず陽イオン交換樹脂によりＬーリジンを吸着、分離させ、ついでＬーグルタミン酸は陰イオン交換樹脂により吸着、分離させるかまたは中和晶析させる。ＬーリジンとＬーグルタミン酸を混合物として用いる場合にはもちろんこれらのアミノ酸を相互に分離することは不要である。

本発明のＬーグルタミン酸生産菌及びＬーリジン生産菌においては、グルタミン酸生合成系遺伝子の発現を強化することにより、Ｌーグルタミン酸生産性を向上させることができる。細胞中で強化されたグルタミン酸生合成系遺伝子の例としては、解糖系のホスホフルクトキナーゼ（PFK、特開昭63-102692号）、アナプレロティック経路のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC、特開昭60-87788号、特開昭62-55089号）、TCA回路のクエン酸合成酵素（CS、特開昭62-201585号、特開昭63-119688号）、アコニット酸ヒドラターゼ（ACO、特開昭62-294086号）、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（ICDH、特開昭62-166890号、特開昭63-214189号）、アミノ化反応を触媒するグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH、特開昭61-268185号）等の遺伝子がある。

さらに、本発明のＬーリジン生産菌においては、リジン生合成系遺伝子を強化することによって、Ｌーリジン生産性を向上させることができる。細胞中で強化されたリジン生合成系遺伝子の例としては、Ｌーリジン及びＬースレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼ $\alpha$ サブユニット蛋白質又は $\beta$ サブユニット蛋白質をコードする遺伝子（W094/25605国際公開パンフレット）、コリネホルム細菌由来の野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（特開昭60-87788号公報）、コリネホルム細菌由来の野生型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子（特公平6-55149号公報）等が知られている。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

<1>ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869（コリネバクテリウム属細菌の野生株）の染色体DNAの調製



ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 を T-Y 培地 (Bacto-trypton (Difco) 1%, Bacto-yeast extract (Difco) 0.5%, NaCl 0.5% (pH 7.2)) 100 ml に接種し、温度 31.5°C で 8 時間培養し、培養物を得た。この培養物を 3,000 r.p.m. で 15 分間、遠心分離処理し湿潤菌体 0.5 g を得た後、該菌体から斎藤、三浦の方法 (Biochem. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)) により染色体 DNA を得た。次いで、この染色体 DNA 60  $\mu$ g 及び制限酵素 Sau3A I、3 ユニットを 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (50 mM NaCl、10 mM MgSO<sub>4</sub> 及び 1 mM ジチオスレイトール含有 (pH 7.4)) におおの混合し、温度 37°C で 30 分間反応させた。反応終了液を常法により、フェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理して Sau3A I で消化されたブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 の染色体 DNA 断片 50  $\mu$ g を得た。

<2>プラスミドベクター DNA を利用したブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 の遺伝子ライブラリーの作製

エシェリヒア・コリとコリネバクテリウム属細菌の双方の菌体内で自律複製可能なプラスミドベクター DNA (pSAC4) 20  $\mu$ g 及び制限酵素 BamH I 200 ユニットを 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (100 mM NaCl 及び 10 mM 硫酸マグネシウム含有 (pH 7.4)) に混合し、温度 37°C で 2 時間反応させて消化液を得、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱処理した。この後、プラスミドベクター由来の DNA フラグメントが再結合することを防止するため、Molecular Cloning 2nd edition (J.Sambrook, E.F.Fritsch and T.Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.56 (1989)) の方法で バクテリアルアルカリホスファターゼ (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理により、DNA 断片の脱リン酸化を行い、常法によりフェノール抽出処理し、更にエタノール沈澱処理を行った。

この BamH I で消化された pSAC4 を 1  $\mu$ g、<1> で得られた Sau3A I で消化されたブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 の染色体 DNA 断片を 1  $\mu$ g、及び 2 ユニットの T4 DNA リガーゼ (宝酒造 (株))

製)を、66 mM塩化マグネシウム、10 mMジチオスレイトール及び10 mM ATPを含有する66 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)に添加し、温度16°Cで16時間反応し、DNAを連結させた。次いで該DNA混合物で、常法によりエシェリヒア・コリ DH5を形質転換し、これを170 µg/mlのクロラムフェニコールを含むL寒天培地上にまき、約20,000個のコロニーを得、遺伝子ライブラリーとした。

### <3>遺伝子ライブラリーDNAによるブレヴィバクテリウム・ラクトファエメンタムAJ11060の形質転換

上記で述べた約20,000個のコロニーより、組換えDNAの回収を行なった。回収の方法は上記に示した斎藤、三浦の方法に従った。

50のバッチに分けた組換えDNA混合物を電気パルス法を用いた形質転換の常法(特開平2-207791号公報)に従い、界面活性剤に対する感受性が上昇した変異株AJ11060株に導入した。形質転換体をグルコース添加寒天L培地上に接種し、31.5°Cで静置培養を行ない、約20,000個の形質転換体を出現させた。次にこれらの形質転換体を界面活性剤30 mg/lを含む同プレートにレプリカし、この中で界面活性剤に対して耐性を示し上記プレート上で生育可能であった株を数株得た。

上記で得られた数株からそれぞれ組換えDNAを抽出し、同DNAを用いてAJ11060株を再形質転換した。ここでも界面活性剤に対して耐性を示した株を得た。これらの株の1株が保持していた組換えDNAをpDTR6と命名した。pDTR6を導入したAJ11060菌は、3 g/Lの界面活性剤を添加した液体培地での生育阻害が抑制されていた(WO 95/23224号国際公開パンフレット参照)。

### <4>変異型d t sR遺伝子の取得

pDTR6プラスミドを、文献 Shortle, D. and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 270(1978)に記載の方法に従い、試験管内でヒドロキシルアミン処理し、これをAJ11060に上記の電気パルス法を用いて導入した。形質転換体約20000株をM-CM2G寒天培地に25°Cにて30時間培養しコロニーを形成させた。これを30 mg/lの界面活性剤を含む同プレート培地に2枚ずつレブ

リカシ 31.5℃および35℃において20時間培養した。その後、31.5℃では生育するが35℃では生育しなかった株を1株取得した。この1株から常法によりプラスミドを抽出し、pDTR-117を取得した。

#### <5>変異型 d t s R 遺伝子の塩基配列決定

上記で得られた pDTR-117 をエシェリヒア・コリ JM109 に導入した。得られたエシェリヒア・コリ JM109 / pDTR-117 をトリプトン1%、酵母エキス0.5%及びNaCl 0.5%からなる培地20mlに温度37℃で24時間前培養し、得られた培養液20mlを上記と同じ組成の培地1lに接種し、温度37℃で3時間培養したのち、0.2gのクロラムフェニコールを添加し、更に同一温度で20時間培養を行い、培養液を得た。次いで、この培養液を3,000r.p.m.で10分間遠心処理して湿潤菌体2gを得、これを20mlの25%ショ糖を含有する350mMトリスー塩酸緩衝液(pH8.0)に懸濁したのち、更にこれにリゾチーム(シグマ社製)10mg、0.25M EDTA溶液(pH8.0)8ml及び20%ドデシル硫酸ナトリウム溶液8mlを各々添加し、温度60℃で30分間保温処理し、溶菌液を得た。この溶菌液に、5M NaCl溶液13mlを添加し、温度4℃で16時間処理した後、15,000r.p.m.で30分間遠心分離した。得られた上清液を、常法によりフェノール抽出処理及びエタノール沈澱処理を行いDNAを沈澱させた。

この沈澱物を減圧乾燥処理した後、1mM EDTAを含有する10mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.5)6mlに溶解し、さらにこれに塩化セシウム6g及びエチジウムブロマイド(19mg/ml)0.2mlを添加し、39,000r.p.m.で42時間超遠心分離機を用いて平衡密度勾配遠心分離処理を行い、DNAを単離した。又更に、n-ブタノールを使用してエチジウムブロマイドを除去した後、1mM EDTAを含有する10mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.5)に対して透析を行い純化された組換えDNA pDTR-117を約500μgを得た。

pDTR-117のクローン化断片の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオケミカル社製)を用いSangerの方法に従って行った。決定された塩基配列およびそ

れから推定されるアミノ酸配列を配列表配列番号1に示す。アミノ酸配列は配列番号2にも示す。

その結果、このクローン化DNA断片は、d t s R遺伝子のコード領域全長を含み、野生型d t s R遺伝子ではC（シトシン）である774番目の塩基がT（チミン）に置換されていることが判明した。この塩基の置換により、コードされるD T S Rタンパク質は、野生型ではP r o残基である139番目のアミノ酸残基が、L e u残基に置換されている。

#### < 6 > 遺伝子置換による変異型d t s R遺伝子導入株の作製

変異型d t s R遺伝子置換株は特開平5-7491号に示される温度感受性プラスミドを用いた相同組換え法により取得した。具体的には上記のp D T R-117をX b a I及びK p n Iにより消化してd t s R遺伝子を含む断片を取得し、p H S G 3 9 8（宝酒造（株）製）をX b a IおよびK p n I切断処理したものと、上記の方法で結合させ、p H S G X-K-117を取得した。

次に、コリネ型細菌で自己複製可能なプラスミドから取得した自己複製能が温度感受性になった変異型の複製起点を持つプラスミドp H S C 4（特開平5-7491号）を制限酵素B a m H I及びK p n Iで消化し、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られたDNA断片をDNA平滑末端化キット（宝酒造（株）製、Blunting kit）を用いて平滑末端化した後、K p n Iリンカー（宝酒造（株）製）を用いて、p H S G X-K-117のK p n I認識部位に導入し、プラスミドp K T C X-K-117を作製した。尚、p H S C 4を保持するエシェリヒア・コリ A J 1 2 5 7 1は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-0046 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号F E R M P-11763として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、F E R M B P-3524の受託番号で寄託されている。

この2つのプラスミドを、各々ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム A T C C 1 3 8 6 9に電気パルス法を用いて導入し、特開平5-7491号に記載の方法で染色体上のd t s R遺伝子を変異型に置換した。具体的には ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム A T C C 1 3 8 6 9 / p K T C X-K-11

7をM-CM2G液体培地で25℃にて6時間振とう培養した後、5  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2G培地上に撒き、34℃でコロニーを形成した株をプラスミド組み込み株として取得した。次にこの株から34℃でクロラムフェニコールに対して感受性になった株をレプリカ法により取得した。この感受性株から34℃において界面活性剤に対する耐性を失った株としてNo. 117株を取得した。この株は染色体上のdtsR遺伝子に変異型に置換されている。

<7> No. 117株のL-グルタミン酸生産性

上記項目<6>で取得したNo. 117株、並びに、WO96/06180号国際公開パンフレットに記載のNo. 11株、No. 77株及びNo. 21株について、WO96/06180号国際公開パンフレットに記載の実施例2と同様にL-グルタミン酸の生産性を評価した。具体的には、以下の様に評価を行った。

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869または上記各株を表1に示す組成の種培養培地に接種し、31.5℃で24時間振とう培養して種培養を得た。表1に示す組成の本培養培地を500ml容ガラス製ジャーファーマンターに300mlずつ分注し加熱殺菌した後、上記種培養を40ml接種した。攪拌速度を800～1300rpm、通気量を1/2～1/1vvmとし、培養温度31.5℃にて培養を開始した。培養液のpHはアンモニアガスで7.5に維持した。培養を開始してから8時間後に培養温度を37℃にシフトした。培養温度のシフトを行わず、31.5℃のまま培養を継続した場合を比較対象とした。

表 1

成 分	濃 度	
	種培養	本培養
グルコース	5 g/dl	15 g/dl
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g/dl	0.2 g/dl
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.04 g/dl	0.15 g/dl
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1 mg/dl	1.5 mg/dl
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1 mg/dl	1.5 mg/dl
大豆蛋白加水分解液	2 ml/dl	5 ml/dl
ビオチン	50 μg/l	200 μg/dl
サイアミン塩酸塩	200 μg/l	300 μg/dl

いずれも20～40時間でグルコースが完全に消費された時点で培養を終了し、培養液中に生成蓄積されたL-グルタミン酸の量を測定した。

その結果、表2に示すようにNo. 117株のL-グルタミン酸収率は特に上昇していた。

表 2

菌 株	L-グルタミン酸 (g/dl)
ATCC13869	0.5
No. 11	7.5
No. 77	6.9
No. 21	8.3
No. 117	9.0

#### 産業上の利用可能性

本発明により、界面活性剤に対する温度感受性変異を有する変異型DTSRタンパク質をコードする変異型dtsR遺伝子が提供される。この変異型DTSRタンパク質を保持し、野生型DTSRタンパク質を保持しないコリネ型細菌は、界面活性剤に対する温度感受性を有し、L-グルタミン酸の生産等に利用できる。

## 請求の範囲

1. 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の 139 番目の L e u 残基が P r o を除く他のアミノ酸残基に変化した配列を有し、温度感受性 D T S R 活性を有するタンパク質。

(B) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、または配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の 139 番目の L e u 残基が P r o を除く他のアミノ酸残基に変化した配列において、139 番目のアミノ酸残基以外の位置における 1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、温度感受性 D T S R 活性を有するタンパク質。

2. 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 1 に記載の DNA。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 359～1987 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 359～1987 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、かつ、温度感受性 D T S R 活性を有するタンパク質をコードする DNA。

3. 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする請求項 1 に記載の DNA。

4. 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の DNA を保持し、野生型 D T S R タンパク質を保持せず、Lーグルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌。

5. Lーリジン生産能をさらに有する請求項 4 に記載のコリネ型細菌。

6. 請求項 4 に記載のコリネ型細菌を、液体培地で培養し、培地中に Lーグルタミン酸を生成蓄積させ、Lーグルタミン酸を該培地から採取することを特徴とする Lーグルタミン酸の製造方法。

7. 請求項 5 に記載のコリネ型細菌を、液体培地で培養し、培地中に Lーリジン及び Lーグルタミン酸を生成蓄積させ、Lーリジン及び Lーグルタミン酸を該培地から採取することを特徴とする Lーリジン及び Lーグルタミン酸の製造方法。

1/5

## 配列表

&lt;110&gt; 味の素株式会社(AJINOMOTO Co., Inc.)

<120> 温度感受性 d t s R 遺伝子

&lt;150&gt; JP 9-184176

&lt;151&gt; 1997-07-09

&lt;160&gt; 2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2047

&lt;212&gt; DNA

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 359..1987

&lt;400&gt; 1

gatcttggaa ctcgacagtt ttcaccgtcc agtttggagc gcctgagctt gcaagctcca	60
gcaagtcagc attagtggag cctgtcactt tttcgtaaata gacctggcca aagtcaccgt	120
tttggagcaa tttttccttc aggagctcaa cgtttagcgg ctctctggat cgtgaaatgt	180
caacgttcat ggaagccaat gtagtgggt cgcgtcgaaa agcgcgcttt aagggcgaca	240
cgcccaaaaa gttttacctt taaaaactac ccgcacgcag cacgaacctg ttcagtgatg	300
taaatcaccg cggaatatatt gtggacgtta ccccgcccta ccgctacgat ttcaaaac	358
atg acc att tcc tca cct ttg att gac gtc gcc aac ctt cca gac atc	406
Met Thr Ile Ser Ser Pro Leu Ile Asp Val Ala Asn Leu Pro Asp Ile	
1 5 10 15	
aac acc act gcc ggc aag atc gcc gac ctt aag gct cgc cgc gcg gaa	454
Asn Thr Thr Ala Gly Lys Ile Ala Asp Leu Lys Ala Arg Arg Ala Glu	
20 25 30	
gcc cat ttc ccc atg ggt gaa aag gca gta gag aag gtc cac gct gct	502
Ala His Phe Pro Met Gly Glu Lys Ala Val Glu Lys Val His Ala Ala	
35 40 45	
gga cgc ctc act gcc cgt gag cgc ttg gat tac tta ctc gat gag ggc	550
Gly Arg Leu Thr Ala Arg Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Leu Asp Glu Gly	
50 55 60	
tcc ttc atc gag acc gat cag ctg gct cgc cac cgc acc acc gct ttc	598
Ser Phe Ile Glu Thr Asp Gln Leu Ala Arg His Arg Thr Thr Ala Phe	
65 70 75 80	
ggc ctg ggc gct aag cgt cct gca acc gac ggc atc gtg acc ggc tgg	646
Gly Leu Gly Ala Lys Arg Pro Ala Thr Asp Gly Ile Val Thr Gly Trp	
85 90 95	
ggc acc att gat gga cgc gaa gtc tgc atc ttc tcg cag gac ggc acc	694
Gly Thr Ile Asp Gly Arg Glu Val Cys Ile Phe Ser Gln Asp Gly Thr	



2/5

100	105	110	
gta ttc ggt ggc gcg ctt ggt gag gtg tac ggc gaa aag atg atc aag			742
Val Phe Gly Gly Ala Leu Gly Glu Val Tyr Gly Glu Lys Met Ile Lys			
115	120	125	
atc atg gag ctg gca atc gac acc ggc cgc cta ttg atc ggt ctt tac			790
Ile Met Glu Leu Ala Ile Asp Thr Gly Arg Leu Leu Ile Gly Leu Tyr			
130	135	140	
gaa ggc gct ggc gct cgc att cag gac ggc gct gtc tcc ctg gac ttc			838
Glu Gly Ala Gly Ala Arg Ile Gln Asp Gly Ala Val Ser Leu Asp Phe			
145	150	155	160
att tcc cag acc ttc tac caa aac att cag gct tct ggc gtt atc cca			886
Ile Ser Gln Thr Phe Tyr Gln Asn Ile Gln Ala Ser Gly Val Ile Pro			
165	170	175	
cag atc tcc gtc atc atg ggc gca tgt gca ggt ggc aac gct tac ggc			934
Gln Ile Ser Val Ile Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Asn Ala Tyr Gly			
180	185	190	
cca gcc ctg acc gac ttc gtg gtc atg gtg gac aag acc tcc aag atg			982
Pro Ala Leu Thr Asp Phe Val Val Met Val Asp Lys Thr Ser Lys Met			
195	200	205	
ttc gtt acc ggc cca gac gtg atc aag acc gtc acc ggc gag gaa atc			1030
Phe Val Thr Gly Pro Asp Val Ile Lys Thr Val Thr Gly Glu Glu Ile			
210	215	220	
acc cag gaa gag ctt ggc gga gca acc acc cac atg gtg acc gct ggc			1078
Thr Gln Glu Glu Leu Gly Gly Ala Thr Thr His Met Val Thr Ala Gly			
225	230	235	240
aac tcc cac tac acc gct gcg acc gat gag gaa gca ctg gat tgg gta			1126
Asn Ser His Tyr Thr Ala Ala Thr Asp Glu Glu Ala Leu Asp Trp Val			
245	250	255	
cag gac ctg gtg tcc ttc ctc cca tcc aac aat cgc tct tac aca cca			1174
Gln Asp Leu Val Ser Phe Leu Pro Ser Asn Asn Arg Ser Tyr Thr Pro			
260	265	270	
ctg gaa gac ttc gac gag gaa gaa ggc ggc gtt gaa gaa aac atc acc			1222
Leu Glu Asp Phe Asp Glu Glu Glu Gly Gly Val Glu Glu Asn Ile Thr			
275	280	285	
gct gac gat ctg aag ctc gac gag atc atc cca gat tcc gcg acc gtt			1270
Ala Asp Asp Leu Lys Leu Asp Glu Ile Ile Pro Asp Ser Ala Thr Val			
290	295	300	
cct tac gac gtc cgc gat gtc atc gaa tgc ctc acc gac gat ggc gaa			1318
Pro Tyr Asp Val Arg Asp Val Ile Glu Cys Leu Thr Asp Asp Gly Glu			
305	310	315	320
tac ctg gaa atc cag gca gac cgc gca gaa aac gtt gtt att gca ttc			1366
Tyr Leu Glu Ile Gln Ala Asp Arg Ala Glu Asn Val Val Ile Ala Phe			
325	330	335	

3/5

```

ggc cgc atc gaa ggc cag tcc gtt gga ttt gtt gcc aac cag cca acc 1414
Gly Arg Ile Glu Gly Gln Ser Val Gly Phe Val Ala Asn Gln Pro Thr
      340                      345                      350
cag ttc gct ggc tgc ctg gac atc gac tcc tct gag aag gca gct cgc 1462
Gln Phe Ala Gly Cys Leu Asp Ile Asp Ser Ser Glu Lys Ala Ala Arg
      355                      360                      365
ttc gtc cgc acc tgc gac gcg ttt aac atc cca atc gtc atg ctt gtc 1510
Phe Val Arg Thr Cys Asp Ala Phe Asn Ile Pro Ile Val Met Leu Val
      370                      375                      380
gac gtc ccc ggc ttc ctt cca ggc gca ggc cag gag tat ggt ggc atc 1558
Asp Val Pro Gly Phe Leu Pro Gly Ala Gly Gln Glu Tyr Gly Gly Ile
      385                      390                      395                      400
ctg cgt cgt ggc gca aag ctg ctc tac gca tac ggc gaa gca acc gtt 1606
Leu Arg Arg Gly Ala Lys Leu Leu Tyr Ala Tyr Gly Glu Ala Thr Val
      405                      410                      415
cca aag att acc gtc acc atg cgt aag gct tac ggc gga gcg tac tgc 1654
Pro Lys Ile Thr Val Thr Met Arg Lys Ala Tyr Gly Gly Ala Tyr Cys
      420                      425                      430
gtg atg ggt tcc aag ggc ttg ggc tct gac atc aac ctt gca tgg cca 1702
Val Met Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ser Asp Ile Asn Leu Ala Trp Pro
      435                      440                      445
acc gca cag atc gcc gtc atg ggc gct gct ggc gca gtc gga ttc atc 1750
Thr Ala Gln Ile Ala Val Met Gly Ala Ala Gly Ala Val Gly Phe Ile
      450                      455                      460
tac cgc aag gag ctc atg gca gct gat gcc aag ggc ctc gat acc gta 1798
Tyr Arg Lys Glu Leu Met Ala Ala Asp Ala Lys Gly Leu Asp Thr Val
      465                      470                      475                      480
gct ctg gct aag tcc ttc gag cgc gag tac gaa gac cac atg ctc aac 1846
Ala Leu Ala Lys Ser Phe Glu Arg Glu Tyr Glu Asp His Met Leu Asn
      485                      490                      495
ccg tac cac gct gca gaa cgt ggc ctg atc gac ggc gtg atc ctg cca 1894
Pro Tyr His Ala Ala Glu Arg Gly Leu Ile Asp Gly Val Ile Leu Pro
      500                      505                      510
agc gaa acc cgc gga cag att tcc cgc aac ctt cgc ctg ctc aag cac 1942
Ser Glu Thr Arg Gly Gln Ile Ser Arg Asn Leu Arg Leu Leu Lys His
      515                      520                      525
aag aac gtc act cgc cct gct cgc aag cac ggc aac atg cca ctg 1987
Lys Asn Val Thr Arg Pro Ala Arg Lys His Gly Asn Met Pro Leu
      530                      535                      540
taaatcggcg aatccataaa ggttcaaaag aattcaataa ggattcgata agggttcgat 2047

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 543

4/5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;400&gt; 2

```

Met Thr Ile Ser Ser Pro Leu Ile Asp Val Ala Asn Leu Pro Asp Ile
 1             5             10             15
Asn Thr Thr Ala Gly Lys Ile Ala Asp Leu Lys Ala Arg Arg Ala Glu
      20             25             30
Ala His Phe Pro Met Gly Glu Lys Ala Val Glu Lys Val His Ala Ala
      35             40             45
Gly Arg Leu Thr Ala Arg Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Leu Asp Glu Gly
      50             55             60
Ser Phe Ile Glu Thr Asp Gln Leu Ala Arg His Arg Thr Thr Ala Phe
      65             70             75             80
Gly Leu Gly Ala Lys Arg Pro Ala Thr Asp Gly Ile Val Thr Gly Trp
      85             90             95
Gly Thr Ile Asp Gly Arg Glu Val Cys Ile Phe Ser Gln Asp Gly Thr
      100            105            110
Val Phe Gly Gly Ala Leu Gly Glu Val Tyr Gly Glu Lys Met Ile Lys
      115            120            125
Ile Met Glu Leu Ala Ile Asp Thr Gly Arg Leu Leu Ile Gly Leu Tyr
      130            135            140
Glu Gly Ala Gly Ala Arg Ile Gln Asp Gly Ala Val Ser Leu Asp Phe
      145            150            155            160
Ile Ser Gln Thr Phe Tyr Gln Asn Ile Gln Ala Ser Gly Val Ile Pro
      165            170            175
Gln Ile Ser Val Ile Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Asn Ala Tyr Gly
      180            185            190
Pro Ala Leu Thr Asp Phe Val Val Met Val Asp Lys Thr Ser Lys Met
      195            200            205
Phe Val Thr Gly Pro Asp Val Ile Lys Thr Val Thr Gly Glu Glu Ile
      210            215            220
Thr Gln Glu Glu Leu Gly Gly Ala Thr Thr His Met Val Thr Ala Gly
      225            230            235            240
Asn Ser His Tyr Thr Ala Ala Thr Asp Glu Glu Ala Leu Asp Trp Val
      245            250            255
Gln Asp Leu Val Ser Phe Leu Pro Ser Asn Asn Arg Ser Tyr Thr Pro
      260            265            270
Leu Glu Asp Phe Asp Glu Glu Glu Gly Gly Val Glu Glu Asn Ile Thr
      275            280            285
Ala Asp Asp Leu Lys Leu Asp Glu Ile Ile Pro Asp Ser Ala Thr Val
      290            295            300
Pro Tyr Asp Val Arg Asp Val Ile Glu Cys Leu Thr Asp Asp Gly Glu

```



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03017

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/31, 1/21, C12P13/08, 13/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/31, 1/21, C12P13/08, 13/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DDBJ/GENEBANK/EMBL, SwissProt, PIR, GeneSeq, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 96/06180, A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 29 February, 1996 (29. 02. 96) & EP, 780477, A1 & BR, 9508730, A1	1-7
X	WO, 95/23224, A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 31 August, 1995 (31. 08. 95) & EP, 752472, A1 & BR, 9506883, A1	1-7
X	KIMURA, E., et al., "Molecular Cloning of a Novel Gene, dtsR, Which Rescues the Detergent Sensitivity of a Mutant Derived from Brevibacterium lactofermentum", Biosci. Biotech. Biochem., Vol. 60, No. 10 (1996), pp.1565-1570	1-7
P, X	JP, 10-87, A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 6 January, 1998 (06. 01. 98) & WO, 97/48790, A1	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 September, 1998 (29. 09. 98)Date of mailing of the international search report  
13 October, 1998 (13. 10. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>°</sup> C12N15/31, 1/21, C12P13/08, 13/14

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>°</sup> C12N15/31, 1/21, C12P13/08, 13/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DDBJ/GENEBANK/EMBL, SwissProt, PIR, GeneSeq, WPI

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 96/06180, A1 (味の素株式会社) 29. 2月. 1996 (29. 02. 96) & EP, 780477, A1 & BR, 9508730, A1	1-7
X	WO, 95/23224, A1 (味の素株式会社) 31. 8月. 1995 (31. 08. 95) & EP, 752472, A1 & BR, 9506883, A1	1-7
X	KIMURA, E., et al. "Molecular Cloning of a Novel Gene, dtsR, Which Rescues the Detergent Sensitivity of a Mutant Derived from Brevibacterium lactofermentum", Biosci. Biotech. Biochem., Vol. 60, No. 10 (1996), pp. 1565-1570	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 09. 98

国際調査報告の発送日

13.10.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

4B

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	J P, 10-87, A1 (味の素株式会社) 6. 1月. 1998 (06. 01. 98) & WO, 97/48790, A1	1-7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**